

Verbesserte C4-Typisierung durch IAGE Neuraminidase- und Carboxy-Peptidase B-behandelter EDTA-Plasmen

P.Kühnl, R.Specht, B.O.Böhm, S.Seidl, W.Spielmann

Institut für Immunhämatologie, Abt.f.Endokrinologie,
Blutspendedienst Hessen, Universität Frankfurt/M., FRG

Ein genetisch determinierter Polymorphismus der vierten Komplementkomponente wurde 1969 zuerst von Rosenfeld et al. beschrieben. Methodische Verbesserungen zeigten einen außerordentlichen, komplexen Polymorphismus. Durch die Vorbehandlung der zu untersuchenden Seren mit Neuraminidase wurde es möglich, ein genetisches Modell des C4-Polymorphismus zu erstellen (Awdeh und Alper, 1980; Mauff et al., 1983). Man kennt heute mindestens zwei eng gekoppelte C4-Loci, jeder mit multiplen Allelen (O'Neill et al., 1978; Whitehead et al., 1984; Carroll et al., 1984). Auf Grund ihrer elektrophoretischen Auftrennungseigenschaften unterscheidet man ein Protein C4A, das anodennäher erscheint, da es mehr negative Ladungen trägt von einem Protein C4B, das langsamer wandert und kathodenwärts liegt. Nach der alten Nomenklatur wurden beide Proteine mit F (fast) und S (slow) angesprochen. Am Genort A sind mindestens 11 Allele, am Genort B mindestens 20 Allele bekannt (Mauff et al., 1983). An beiden Genorten sind mit unterschiedlich hoher Frequenz Nullgene zu finden (O'Neill et al., 1978).

Mauff et al. (1983) berichteten über einen genetisch determinierten Polymorphismus der β -Kette des menschlichen C4-Systems. Aus dem Pro-C4 werden 3 Ketten abgespalten. Eine davon ist die β -Kette mit 78.000 Dalton. Es wurden drei verschiedene C4- β -Kettenbandenmuster (H, HL, L) gefunden. Die beobachteten Phänotypen erfüllten jedoch nicht die Bedingungen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts für kodominante Allele. Es konnten keine Beziehungen der β -Ketten-Phänotypen zu den α -Ketten-Phänotypen nachgewiesen werden. Ein Polymorphismus der menschlichen β -Kette wurde bislang noch nicht beschrieben. Beide Proteine, C4A und C4B zeigen ein sehr enges antigenes

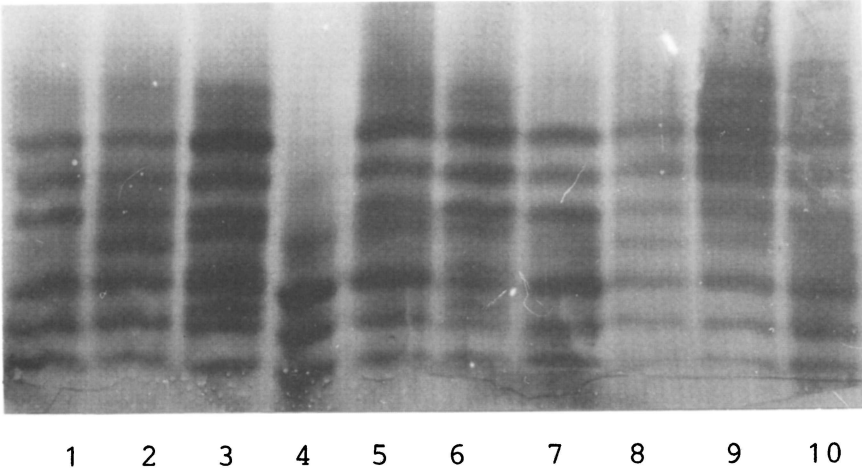


Abb. 1: Darstellungstechnik C4 durch IAGE mit Immuno-Blotting (Doxiadis, Essen, 1985)
Phänotypen: 1) A3 B1 2) A3 B1,2
3) A3 B1,3 4) AQO B1 5) A3 B1
6) A3 B1,3 7) A3 B1 8) A3 B1,2
9) A2,3 B1 10) A3 B1

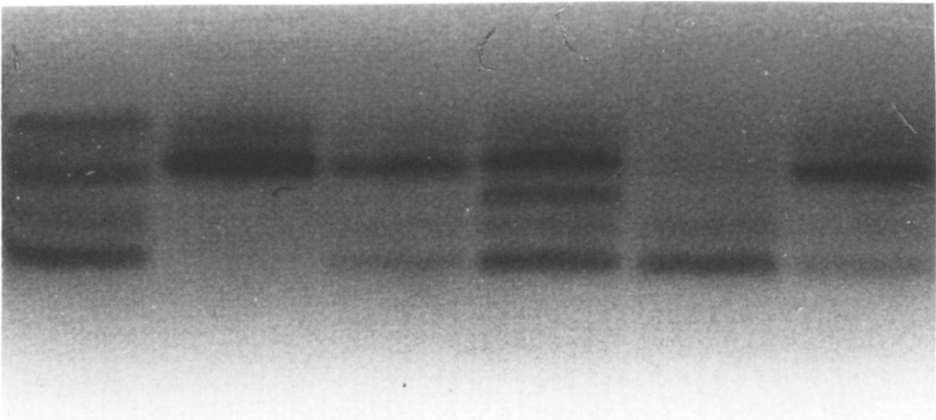


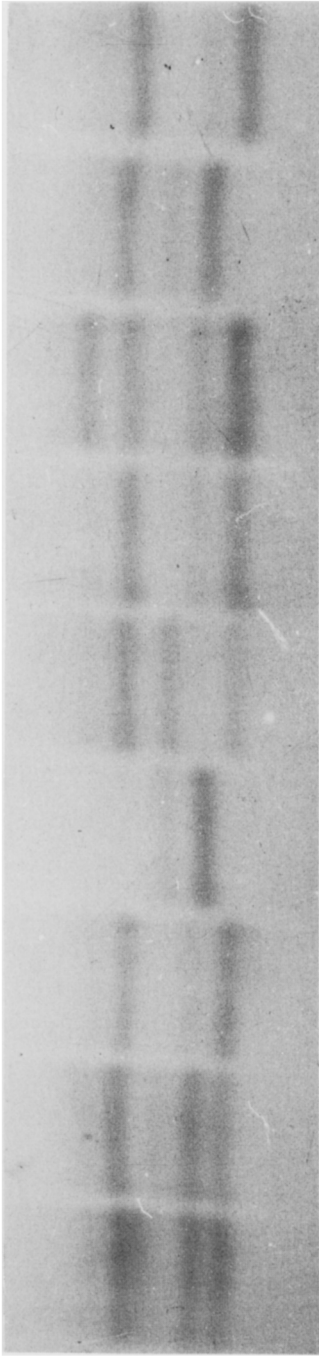
Abb. 2: Darstellung der C4-Phänotypen durch IAGE von CPN/CPB-behandelten EDTA-Plasmen (Genotypen-Schreibweise und Versuch einer Abschätzung von QO-Heterozygotie)
1) A3,QO B1,1 2) A3,3 BQO,QO 3) A3,3 B1,QO
4) A3,3 B1,6 5) AQO,QO B1,1 6) A3,3 B1,QO

Verhältnis zu den ursprünglich als erythrozytär determiniert angesehenen Blutgruppenmerkmalen Rodgers (Rg = C4A) und Chido (Ch = C4B) (O'Neill et al., 1978; Rittner et al., 1984). Diese beiden Blutgruppenantigen-Systeme sind identisch mit Strukturen auf der α -Kette der vierten Komplementkomponente (Tilley et al., 1978; Giles et al., 1984), welche sich nach Spaltung von C4 und Bindung der Spaltprodukte an Erythrozytenmembranen nachweisen lassen. Die von Middleton et al. (1974) nachgewiesene Koppelung zwischen Rg-, Ch- und HLA-Genen stellte somit eine vorweggenommene Entdeckung der C4-HLA-Koppelung dar.

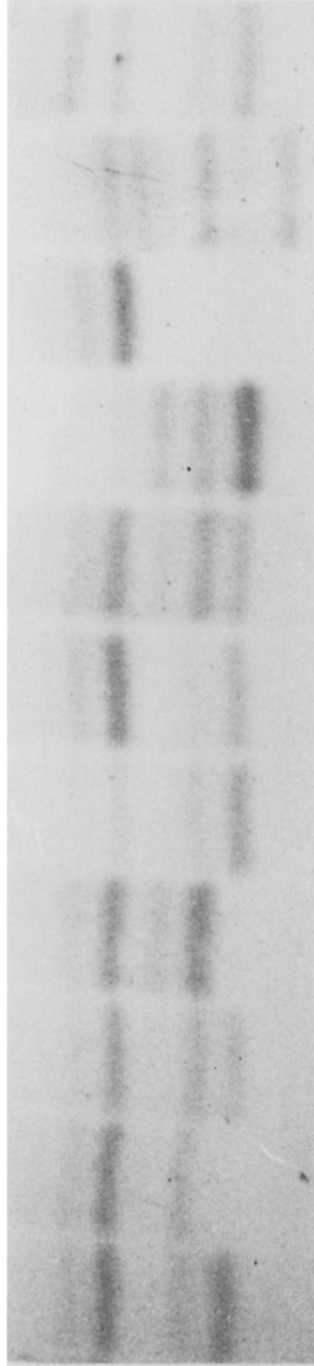
Bemerkenswert ist weiterhin die unterschiedliche hämolytische Aktivität der beiden Proteine C4A und C4B. Unter gleichen Bedingungen zeigt das B-Protein eine beträchtlich größere funktionelle Aktivität gemessen am Hämolysegrad (Bitzan et al., 1983). Die biologische Bedeutung dieser Tatsache ist bisher noch unklar. Der Grund scheint jedoch auf molekularer Ebene zu liegen, denn die Bindung von aktiviertem C4B an Schafserythrozyten ist vierfach stärker als die von aktivierten C4A (Isenmann und Young, 1984).

Sim und Cross (1987) wiesen erstmals auf eine verbesserte Typisierungsmöglichkeit des C4 durch gleichzeitige Behandlung von EDTA-Plasmen mit Neuraminidase (Clostridium Perfringens Neuraminidase (= CPN Typ V oder VIII) und Carboxy-Peptidase B (= CPB-DFP) hin. Nach 3 h AGE (pH 8,9) mit anschließender Immobilisation sowie durch IPAGIF (2,5 bis 3,5 h, pH-Bereich 5 - 8) lassen sich die bislang komplexen C4-Bandenmuster deutlich vereinfachen (s. Abb. 1), so daß nur noch eine Haupt-Isoproteinbande pro C4-Strukturgen zur Darstellung kommt (Abb. 2 und 3). Auch eine Abschätzung der Heterozygotie für die häufigen stummen Gene beider Loci (C4A*Q0 und C4B*Q0) war auf diese Weise möglich.

Insgesamt ergaben sich bei 368 nicht-verwandten gesunden Blutspendern aus Hessen sowie 15 Familien mit 36 Kindern Hinweise auf 42 verschiedene Phänotypen, die als Genprodukte von sieben C4A-Allelen und acht C4B-Allelen mit den folgenden Frequenzen interpretiert wurden: C4*A3 = 0,7885, *AQ0 = 0,1272, *A2 = 0,0444;



A 3.2 A 4.3 A 3.0 A 00 A 3.3 A 3.3 A 3.3 A 3.3 A 3.3
 B 1.2 B 1.2 B 1.1 B 2.2 B 1.5 B 1.1 B 1.1 B 2.2 B 1.1



A 3.3 A 4.3 A 3.3 A 4.3 A 3.0 A 3.3 A 3.3 A 13.0 A 3.3 A 2.4 A 3.6
 B 1.1 B 2.0 B 1.2 B 2.2 B 1.1 B 1.0 B 1.2 B 1.1 B 00 B 2.92 B 1.1

Abb. 3: Darstellung der C4-Phänotypen nach IAGE von CPN/CPB-behandelten EDTA-Plasmen

*A6 = 0,0296, *A4 = 0,0044, *A13 = 0,0044, *A5 = 0,0015;
C4*B1 = 0,7101, *BQO = 0,1583, *B2 = 0,1139, *B6 = 0,0059,
*B3 = 0,0044, *B5 = 0,0030, *Bvar = 0,0044.

Die hier vorgestellte Modifikation der kombinierten CPN/CPB-Vorbehandlung des C4 kann zwar den funktionellen Assay nicht ersetzen: Er weist eine höhere hämolytische Kapazität der C4-Genprodukte nach, die sich nach elektrophoretischer Trennung mit den "langsamen" C4A-Varianten überschneiden; dennoch ist die hier vorgestellte Modifikation ein vielversprechender Schritt in Richtung einer erweiterten MHC-Analyse durch die Erfassung sogenannter complotypes, welche neben den HLA-Antigenen auch C2, BF und die GLO umfassen.

Literatur beim Verfasser